



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CUATRO VARIEDADES DE  
BROCOLI A *Plasmodiophora brassicae* Woronin.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**FABIÁN TARQUINO SALCEDO RUALES**

**RIOBAMBA- ECUADOR**

**2016**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**

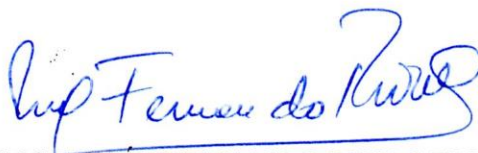
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

El suscrito **TRIBUNAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN, CERTIFICA QUE:** el trabajo de investigación titulado: **“EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CUATRO VARIEDADES DE BROCOLI A *Plasmodiophora brassicae* Woronin.”**, de responsabilidad del Sr. Egresado Fabián Tarquino Salcedo Ruales, ha culminado y fue prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación y defensa.



ING. VÍCTOR ALBERTO LINDAO CÓRDOVA

**DIRECTOR**



ING. JOSÉ FERNANDO RIVAS FIGUEROA

**ASESOR**

**RIOBAMBA - ECUADOR**

**2016**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Fabián Tarquino Salcedo Ruales, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes y el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 14 de Noviembre 2016.



Fabián Tarquino Salcedo Ruales

Cedula de Ciudadanía: 060410626-0

## **DEDICATORIA**

A mi padre por acompañarme durante todos los momentos de mi carrera y ser un ejemplo y guía durante toda mi vida, inculcarme valores y saber corregir mis equivocaciones. A mi madre que aunque ya no este entre nosotros ella fue quien me hizo la persona que soy, me brindo su amor incondicional y supo estar siempre a mi lado en los momentos difíciles. A mi familia por su constante apoyo y amor. A mis profesores que fueron el centro del conocimiento y los orientadores, gracias por su tiempo y paciencia.

Fabián Salcedo Ruales

## **AGRADECIMIENTO**

Doy las gracias a mi padre y mi familia por su constante apoyo y confianza. A la Ing. Andrea Román que fue un soporte y guía durante la elaboración de este trabajo, le agradezco por su paciencia y estar siempre dispuesta a bríndame conocimiento, al Ing. Víctor Lindao por su colaboración y ayuda fue posible la realización y culminación de este trabajo de investigación y al Dr. Fernando Rivas por sus consejos y enseñanza que llevaron a la mejora del estudio.

Fabián Salcedo Ruales

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii

## CAPÍTULO

I. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CUATRO VARIEDADES DE BROCOLI A <i>Plasmidiophora brassicae</i> Woronin.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	1
A. JUSTIFICACIÓN .....	2
B. HIPÓTESIS .....	2
1. Hipótesis nula.....	2
2. Hipótesis alternante.....	2
C. OBJETIVOS .....	3
1. General .....	3
2. Específicos .....	3
III. REVISION DE LITERATURA .....	4
A. MARCO CONCEPTUAL .....	4
1. Razas fisiológicas.....	4
2. Severidad.....	4
3. Incidencia .....	4
4. Evaluación.....	4

5. Resistencia.....	5
6. Variedad .....	5
B. MARCO TEÓRICO .....	5
1. Interacción planta - patógeno .....	5
a. Resistencia Horizontal.....	7
b. Resistencia vertical.....	7
c. Resistencia aparente .....	8
2. Características del patógeno.....	8
a. Clasificación taxonómica .....	9
b. Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.....	9
c. Síntomas .....	10
d. Ciclo de vida.....	12
1) Sobrevivencia en el suelo .....	12
2) Infección en los pelos radicales .....	12
3) Infección cortical .....	13
e. Manejo.....	14
f. Hospederos .....	15
3. Variedades.....	15
a. Avenger .....	15
b. Legacy .....	16
c. SK6-401 (AF-1522).....	16
d. Coronado .....	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR .....	18
1. Localización .....	18

2. Ubicación geográfica .....	18
3. Condiciones climatológicas .....	18
4. Clasificación ecológica .....	18
5. Características del suelo .....	19
a. Características del sustrato .....	19
B. MATERIALES .....	19
1. Material biológico .....	19
2. Materiales de campo .....	19
3. Materiales de oficina .....	19
4. Materiales de investigación .....	20
C. METODOLOGÍA .....	20
1. Diseño experimental .....	20
2. Especificaciones del campo experimental .....	20
3. Tratamientos en estudio .....	20
4. Normalizar de datos .....	21
5. Análisis estadístico .....	21
6. Análisis funcional .....	22
D. MANEJO DEL ENSAYO .....	23
1. Recolección de muestras para preparación del inóculo .....	23
2. Preparación de inóculo .....	23
3. Inoculación .....	24
4. Manejo del ensayo .....	24
a. Instalación del ensayo .....	24
b. Labores culturales .....	25
1) Manejo de malezas .....	25



2) Fertilización .....	25
3) Nutrición a base de aspersiones foliares .....	25
4) Control fitosanitario .....	25
5) Eliminación del sustrato .....	26
E. EVALUACIÓN DEL ENSAYO .....	26
1. Severidad .....	26
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
A. RESULTADOS .....	28
1. Porcentaje de índice de enfermedad a los 20, 40, 60, 80 y 100 días después de la inoculación (ddi) .....	28
2. Valor de pH del suelo y las raíces en los diferentes tratamientos durante el desarrollo del ensayo. ....	39
B. DISCUSION .....	41
1. Severidad a los 20 días después del inóculo .....	41
2. Severidad a los 40 días después del inóculo .....	41
3. Severidad a los 60 días después del inóculo .....	42
4. Severidad a los 80 y 100 días después del inoculo .....	43
5. pH .....	44
6. Peso y diámetro .....	44
VI. CONCLUSIONES .....	46
VII. RECOMENDACIONES .....	47
VIII. RESUMEN .....	48
IX. SUMARY .....	49
X. BIBLIOGRAFÍA .....	50
XI. ANEXOS .....	57

## LISTA DE CUADROS

Nº	DESCRIPCIÓN	PAG
Cuadro 1	Distancias de siembra de las distintas variedades .....	17
Cuadro 2	Composición del sustrato .....	19
Cuadro 3	Tratamientos en estudio .....	21
Cuadro 4	Análisis de varianza (adeva) para los cultivares .....	22
Cuadro 5.	Composición del sustrato .....	24
Cuadro 6.	Dosis de fertilizante .....	25
Cuadro 7.	Escala de severidad .....	26
Cuadro 8.	Análisis de varianza para el porcentaje de severidad a los 20 ddi .....	28
Cuadro 9.	Evaluación de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 20 ddi. ..	29
Cuadro 10.	Análisis de varianza para el porcentaje de severidad a los 40 ddi. ....	30
Cuadro 11.	Evaluación de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 40 ddi.	31
Cuadro 12.	Análisis de varianza para el porcentaje de severidad a los 60 ddi. ....	32
Cuadro 13.	Evaluación de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 60 .....	33
Cuadro 14.	Análisis de varianza para el porcentaje de severidad a los 80 ddi. ....	34
Cuadro 15.	Evaluación de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 80 ddi.	35
Cuadro 16.	Análisis de varianza para el porcentaje de severidad a los 100 ddi. ....	36
Cuadro 17.	Evaluación de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 100 ddi. .....	37
Cuadro 18.	Cuadro resumen de la severidad en las distintas variedades de brócoli a los 20, 40, 60, 80 y 100 ddi. ....	38
Cuadro 19.	Promedio de los valores de pH en la raíz y suelo .....	39
Cuadro 20.	Evaluación de componentes del rendimiento agrícola en las cuatro variedades de brócoli (Avenger, Legacy, Coronado y SK6) inoculadas con P. Brassicae y sin inóculo. .....	40

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Nº</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>PAG</b>
	Gráfico 1. Severidad a los 20 días después del inóculo .....	29
	Gráfico 2. Severidad a los 40 días después del inoculo.....	31
	Gráfico 3. Severidad a los 60 días después del inoculo.....	33
	Gráfico 4. Severidad a los 80 días después del inoculo.....	35
	Gráfico 5. Severidad a los 100 días despues del inoculo.....	37
	Gráfico 6. Promedio de los valores de pH para cada tratamiento.....	40

## LISTA DE ANEXOS

Nº	DESCRIPCIÓN	PAG
	Anexo 1. Severidad presentada en el ensayo mediante la escala propuesta por Horiuchi y Hori y modificada por Strelkov et al. (2006), tratamientos sin inculo. ....	57
	Anexo 2. Datos normalizados de severidad, tratamientos sin inculo. ....	59
	Anexo 3. Severidad presentada en el ensayo mediante la escala propuesta por Horiuchi y Hori y modificada por Strelkov et al. (2006), tratamientos con inculo. ....	61
	Anexo 4. Datos normalizados de severidad, tratamientos con inculo. ....	63
	Anexo 5. Diámetro y peso .....	65
	Anexo 6. Recolección de muestras .....	67
	Anexo 7. Construcción del invernadero .....	68
	Anexo 8. Preparación del inculo.....	69
	Anexo 9. Cultivo.....	70
	Anexo 10. Manejo de malezas .....	71
	Anexo 11. Recolección de muestras .....	72
	Anexo 12. <i>Plasmodiophora brassicae</i> Woronin.....	73

## **I. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CUATRO VARIEDADES DE BROCOLI A *Plasmodiophora brassicae* Woronin.**

## **II. INTRODUCCIÓN**

El cultivo de brócoli es muy demandado a nivel mundial por lo que se estima según el MAGAP, (2012) que la producción del brócoli entre el año 2000 al 2012, registró un crecimiento del 41.88%, el mismo que paso de 14 989 000 toneladas producidas en el año 2000 a 21266 789 toneladas en el 2012; convirtiéndose en una tendencia al alza.

Debido a su demanda tanto para el consumo interno y de exportación las áreas cultivables se han incrementado con lo cual se obtuvo nuevos problemas sanitarios en este cultivo. Tal es el caso de la hernia de la col cuyo agente causal es el protozoo *Plasmodiophora brassicae* Woronin, que en la última década en el Ecuador se ha convertido en un problema de importancia sanitaria en este cultivo y otras crucíferas que se cultivan en la Sierra ecuatoriana. La hernia es una enfermedad ampliamente difundida en muchos países de Europa y América donde ocasiona serios daños a la economía. A nivel mundial se considera que el patógeno produce pérdidas entre un 10 al 15% Dixon (2009), debido a la muerte prematura o un crecimiento limitado de la planta y la aparición de los quistes que el patógeno puede formar y que pueden permanecer viables por más de 15 años reducen la rentabilidad del cultivo. Esta enfermedad produce un alto impacto económico en los cultivos de Brassicaceas. Este patógeno infecta a un amplio rango de hospederos, entre las que se destacan las siguientes: col, coliflor, col china, brócoli, coles de bruselas, nabo, el rábano, la mostaza y muchas variedades de hortalizas. Sin embargo los síntomas típicos de la hernia de la col se observan sólo en los miembros de la familia de las brassicaceas. Por lo que se considera importante la búsqueda de un adecuado manejo del patógeno debido a que las medidas convencionales como la utilización de agroquímicos no suele ser efectiva, en este aspecto existen recomendaciones encaminadas en el manejo del patógeno entre las que se menciona la implementación de variedades resistentes que se considerarían como alternativa que los agricultores pueden incorporar en su programa de manejo en este cultivo.

## A. JUSTIFICACIÓN

La hernia de la col causada por el patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin, se considera como el principal problema de las crucíferas tanto en Europa como en América y actualmente en nuestro país Ecuador. Este patógeno afecta principalmente al brócoli, uno de los cultivos más importantes para nuestro país. En la provincia Chimborazo muchos agricultores de las zonas de: Tunshi, San Luis, San Juan, Gatazo, Chambo entre otros; han informado de la presencia del patógeno, pero aún no se ha realizado un diagnóstico confirmativo de la enfermedad en los organismos pertinentes ni se han implementado medidas para disminuir los daños causados por la presencia del mismo. En este caso entre las propuestas sugeridas a nivel mundial está la implementación de nuevas variedades resistentes que sumadas a otras alternativas de manejo podrían disminuir el daño causado. Es por este motivo, con la presente investigación se pretende evaluar las nuevas variedades de brócoli siendo una de ellas moderadamente resistente al patógeno, bajo las condiciones del país en el cual fueron desarrolladas, para demostrar si presentan estas mismas características bajo las condiciones ambientales del nuestro y considerando que el patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin tiene diferentes patotipos (razas), se busca una posible alternativa o estrategia para el manejo sanitario requerido por los agricultores de la Sierra Ecuatoriana.

## B. HIPÓTESIS

### 1. Hipótesis nula

Ninguna variedad es resistente al patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin

### 2. Hipótesis alternante

Al menos una variedad es resistente al patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin.

## C. OBJETIVOS

### 1. General

Evaluar la resistencia de cuatro variedades de brócoli (Avenger, Legacy, Coronado, SK6) a *Plasmodiophora brassicae* Woronin, en la provincia de Chimborazo para desarrollar en el futuro alternativas de manejo eficientes.

### 2. Específicos

Desarrollar un protocolo de inoculación para las plantas de las variedades Avenger, Legacy, SK6-401 y Coronado bajo condiciones controladas.

Determinar la severidad de la enfermedad y evaluar la magnitud de los daños ocasionados para las variedades Avenger, Legacy, SK6-401, Coronado.

### **III. REVISION DE LITERATURA**

#### **A. MARCO CONCEPTUAL**

##### **1. Razas fisiológicas**

Es un taxón inferior a forma especial, que se diferencia fisiológicamente por su mayor o menor virulencia cuando infecta a una serie dada de variedades de plantas. (Roberts, 1978)

Individuos que tienen una particular patogenicidad en común. (Hernandez, 2010)

##### **2. Severidad**

Es una estimación visual en la cual se establecen grados de infección en una determinada planta, sobre la base de la cantidad de tejido vegetal enfermo. Es subjetiva y hace referencia al % del área necrosada o enferma de una hoja, fruto, espiga, etc. Es el parámetro que mejor está relacionado con la gravedad de la enfermedad y con los daños causados. (Herrera, 2013)

##### **3. Incidencia**

Es la cantidad de individuos o partes contables de un individuo (plantas, frutos, hojas, etc.) afectados por una determinada enfermedad respecto al total analizado expresada en %. Es un valor objetivo. Esta medida es útil para medir el patrón de distribución en el campo de enfermedades donde toda la planta está afectada. (Herrera, 2013)

##### **4. Evaluación**

Evaluar consiste en atribuir un valor a algo o a alguien, en función de un proyecto implícito o explícito. (Gonzales, 2015)

Análisis de una cosa que determina su valor, importancia o trascendencia. (RAE, 2007)



Maccario, (1989) considera que la "Evaluación es el acto que consiste en emitir un juicio de valor, a partir de un conjunto de informaciones, con el fin de tomar una decisión."

## **5. Resistencia**

La resistencia por su parte es la capacidad que tiene el huésped de contrarrestar la acción del patógeno. La resistencia de las plantas a las enfermedades es debido a la presencia de determinados genes R (resistencia) que tienen la capacidad de detectar el ataque de patógenos y facilitar la respuesta defensiva en la planta huésped. (Gururani, et al., 2012)

## **6. Variedad**

Taxonómicamente es una subdivisión de una especie, ya sea formada en los procesos evolutivos por la selección natural (variedades criollas o regionales), o por fitomejoramiento (variedad mejorada, híbridos simples, dobles, etc., en especies alógamas o, líneas puras, compuestos multilineales, etc. en autógamias), para siembras comerciales (Alicante, 2013)

Una variedad agronómica es un grupo de plantas o individuos que tienen características sobresalientes para los cuales el fitomejorador los ha seleccionado. (Pirillo, 2009)

# **B. MARCO TEÓRICO**

## **1. Interacción planta - patógeno**

Los mecanismos que activan las señales para la activación de la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de un patógeno están bien comprendidos dentro de las interacciones planta-patógeno. En este caso la inducción de defensa por parte de la planta se debe al reconocimiento de ciertas moléculas llamadas "efectores" que produce el patógeno, estos efectores pueden cambiar el estado fisiológico de la planta huésped con el fin de beneficiarse o pueden interrumpir la activación de las defensas de la planta huésped. Sin

embargo, las plantas han desarrollado una forma de inmunidad que se basa en la percepción de estos efectores por proteínas de resistencia de la planta llamados R (gen que media la resistencia al patógeno) (Belkhadir, Subramaniam, & Dangl, 2004). Dichos genes han sido caracterizados e investigados por lo cual estos han sido utilizados para el desarrollo de variedades resistentes que sirve como alternativa para reducir la utilización de pesticidas y otros químicos empleados para el control de enfermedades. (Belkhadir, et al., 2004)

Entre los beneficios que se describen están la eficiencia en la reducción del daño causado por patógenos, minimizar los daños causados por el patógeno, reducción en la utilización de agroquímicos y el más importante que es una estrategia más amigable con el ambiente. (Belkhadir, et al., 2004)

Van Der Plank. (1968) definió a la resistencia de la plantas como la habilidad que tiene para superar completa o parcialmente los efectos del patógeno.

Es así que la resistencia estaría definida por varias vías genéticas que se han descrito en los últimos años por lo que de acuerdo a la teoría de Flor, (1955) se considera que por cada gen de virulencia del patógeno hay un gen de resistencia del hospedero y viceversa. En la mayoría de las enfermedades, una variedad es resistente a un patógeno como resultado de varios genes al mismo tiempo el patógeno tiene varios genes de virulencia, cada gen del patógeno es reconocido por un gen del hospedante, los genes del hospedante son dominantes ( R ), y los genes que otorgan susceptibilidad a la enfermedad se denominan recesivos ( r ), mientras que en el patógeno los genes que determinan el grado de virulencia ( A ) son dominantes, y los genes que determinan la virulencia son recesivos. (Cifuentes, 2006).

Por lo que se puede considerar a la resistencia de dos tipos monogénica y poligénica. A estos tipos de resistencia se le denomina verdadera. (Cifuentes, 2006)

#### **a. Resistencia Horizontal**

También conocida como poligénica, múltiple o cuantitativa, está bajo el control de muchos genes, los cuales por separado pueden ser ineficaces para contrarrestar el ataque de un patógeno, este tipo de resistencia retarda el desarrollo de las enfermedades y retrasa la propagación de enfermedades. (Cifuentes, 2006)

La resistencia horizontal se caracteriza por su estabilidad, la cual está dada por los patotipos de agresividad media contra las variantes extremas; este tipo de resistencia muestra una reducción cuantitativa de los índices de infección, tiempo de incubación y tasa de desarrollo de reproducción de la enfermedad, que produce un retraso en su desarrollo. Este tipo de resistencia se efectúa mediante la utilización de multilíneas, que no es más que el cultivar constituido por varios genes de resistencia a la enfermedad para la cual se trabaja. (Dimitrova, 2009)

Por lo tanto esta resistencia permite una protección completa a la enfermedad ya que actúa contra todos los patotipos del patógeno. (Dimitrova, 2009)

#### **b. Resistencia vertical**

También conocida como resistencia monogénica, oligogénica o cualitativa dado que está controlada por uno o varios genes, inhibe principalmente el desarrollo inicial del patógeno, el hospedante por lo general responde al reaccionar a la virulencia; algunas especies tienen 20 o 40 genes resistentes contra un patógeno. (Cifuentes, 2006) Generalmente se ha considerado a la resistencia vertical para reducir la frecuencia de infección del inóculo, bloqueando el desarrollo del patógeno y así retrasar la epidemia potencial. (Van Der Plank, 1968)

La escasa duración de la resistencia vertical en algunas interacciones ha llevado a los mejoradores a la búsqueda de la resistencia poligénica. Sin embargo al presentarse en plantas que son resistentes a algunas razas de patógenos y susceptibles a otras razas del

mismo patógeno, nos permite diferenciar entre las razas de un patógeno. El mejoramiento en busca de resistencia vertical se realiza a través de líneas puras con uno o varios genes incluidos con resistencia a la enfermedad. (Dimitrova, 2009)

Los efectos más significativos de esta resistencia son el retraso del inicio de la epidemia producto de la reducción de la cantidad efectiva de inóculo inicial. Además al producir resistencia solo contra algún gen virulento específico del patógeno aporta una protección incompleta a la enfermedad ya que no sería efectiva contra todos los patotipos del patógeno. (Dimitrova, 2009)

La diferencia entre la resistencia monogénica y poligénica radica en que la primera es controlada por uno o varios genes por lo cual esta forma de resistencia se puede romper fácil y rápidamente por la mutación de un solo gen o, a veces, de pocos genes, en cambio la resistencia poligénica está controlada por muchos genes lo cual ofrece una mayor durabilidad y estabilidad debido al efecto amortiguador del sistema poligénico.

### **c. Resistencia aparente**

Se presenta cuando a pesar del ataque de un patógeno, la planta que es susceptible al mismo se encuentra libre de la infección o los síntomas y de esta manera son resistentes. Se da principalmente cuando uno de los tres factores necesarios para que se desarrolle la enfermedad (hospedante susceptible, patógeno virulento y ambiente favorable) no coincidan e interactúen negativamente. (Agrios, 2005)

## **2. Características del patógeno (*Plasmodiophora brassicae* Woronin)**

Es un patógeno obligado que puede ser transmitido por el suelo, esta enfermedad conduce a la formación de agallas en las raíces de la plantas susceptibles dando como resultado un retardo en el crecimiento, marchitez y hasta la muerte. (Agrios, 2005).

La enfermedad fue reportada por primera vez en los Estados Unidos en el año de 1852. Otros reportes de la destructiva enfermedad se han encontrado en San Petersburgo Rusia a finales de siglo XIX. Esta enfermedad fue estudiada por vez primera en 1872 por Woroni, un científico ruso, quien logró identificar la causa de la hernia como "organismo *plasmodiophorous*" en 1875, y le dio el nombre de *Plasmodiophora brassicae*, este investigador reportó que la espora infecciosa era una zoospora con un flagelo, pero en 1934, Ledingham demostró la existencia de un segundo flagelo más corto. (Rivera, 2007)

#### **a. Clasificación taxonómica**

El patógeno responsable de la enfermedad denominada hernia o nudo de la raíz de las crucíferas es *Plasmodiophora brassicae* Woronin, cuya clasificación taxonómica según Kirk (2015) es la siguiente:

Reino:	Protozoa
Phylum:	Cercozoa
Orden:	Plasmodiophorida
Familia:	Plasmodiophoridae
Género:	<i>Plasmodiophora</i>
Especie:	<i>Plasmodiophora brassicae</i> Woronin

#### **b. Condiciones para el desarrollo de la enfermedad**

Algunos factores son fundamentales para el desarrollo del patógeno en este caso el pH de suelo juega un rol fundamental. La hernia de las crucíferas, ocasionada por *Plasmodiophora brassicae* Woronin, es más predominante y severa a un pH cercano a 5.7, mientras que su desarrollo decae pronunciadamente entre 5.8 y 6.2 y se inhibe parcialmente a un pH de 7.8. (Agrios, 2005)

Otro factor importante es la humedad de suelo en este caso si el suelo se encuentra en capacidad de campo favorece su desarrollo. (Castillo, & Guerrero, 2008)

Por lo tanto las condiciones favorables para el desarrollo del protozoo son de una humedad del suelo mayor del 50% de la capacidad de campo, humedad relativa de 80 a 85 % y pH de 5 a 7. Cuando todos estos factores llegan a conjugarse, la infección puede alcanzar hasta un 100% de incidencia. (Rivera, 2007)

### **c. Síntomas**

Las plantas que han sido infectadas poseen hojas amarillentas o de color verde pálido. Durante el día las plantas se observan debilitadas y marchitas sobre todo al mediodía, pero en la noche recupera su turgencia. Al principio estas plantas muestran un desarrollo casi normal, pero con el tiempo se empiezan a atrofiar. Esto es el producto de la infección por el plasmodio que no sólo utiliza la mayor parte del alimento requerido para el desarrollo normal de la planta, sino que también interfieren con la absorción y translocación del agua y nutrientes a través del sistema radical. (Agrios, 2005)

Si la presión del inoculo es alta las plantas jóvenes pueden morir al poco tiempo después de la infección, mientras que si el ataque se produce en plantas adultas, estas sobreviven pero su producción es reducida o no puede ser comercializada (Agrios, 2005). Además ataques menos severos en plantas jóvenes o ya desarrolladas solo producen deformaciones en las raíces. Pero si la infección es tardía, la planta se desarrolla menos y puede sobrevivir. (Dao, & Holmquest, 1962)

Por lo tanto los síntomas más importantes que se pueden observar están en sus raíces, estos son la hipertrofia e hiperplasia del tejido de las raíces que al desenterrar se observa una serie de hernias que en muchos casos puede ocupar la totalidad de la raíz (Najera, 2010), con lo cual tienen una capacidad limitada para la absorción de agua y nutrientes, lo que a menudo conduce a los síntomas de deficiencia de nutrientes. (Karling, 1942)



Figura 1. Plante de brócoli con síntomas de amarillamiento y reducción del crecimiento causado por *Plasmodiophora brassicae* Woronin. (Rivera, 2007)



Figura 2. Síntomas de hipertrofia e hiperplasia del de las raíces de brócoli causadas por el patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin. (Rivera, 2007)

En algunos hospederos como nabos y rábanos, no se forman agallas cuando se infectan por el patógeno; en este caso se observan lesiones de color negro hundidas a lo largo de la superficie de la raíz. (Najera, 2010)

#### **d. Ciclo de vida**

*Plasmodiophora brassicae* Woronin, tiene tres etapas en su ciclo de vida: que son la sobrevivencia en el suelo, infección en los pelos de la raíz e infección cortical. (Ayers, 1944; Ingram, & Tommerup, 1972; Naiki, 1987)

##### **1) Sobrevivencia en el suelo**

*Plasmodiophora brassicae* Woronin, produce estructuras de resistencia denominadas quistes los cuales tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo. Varios autores han descrito acerca del tiempo que puede permanecer viable el patógeno, en este caso se habla de periodos de 3 a 6 años e incluso 17 años (Gibbs, 1931; Wallenhammar, 1996; White, 1979). La germinación de los quistes es el primer paso en el ciclo de vida del patógeno. Según el estudio de Yano, Tanaka, Kameya, & Katumoto, (1991), demostraron que la liberación de los iones de calcio desencadena la germinación de las esporas de descanso. Además la germinación de los quistes depende de la edad de las raíces ya que se ha demostrado que a partir de raíces con hernias viejas incluso descompuestas tiene mayor poder de germinación que las extraídas de hernias duras pequeñas. (Macfarlane, 1970) Los resultados sugieren que las poblaciones de esporas en reposo tienen diferentes niveles de maduración y que su capacidad de germinación se asocia con el nivel de maduración de las mismas. (Takahashi, 1994; Friberg, Lagerlöf, & Rämert, 2005)

##### **2) Infección en los pelos radicales**

El inoculo primario está compuesto por esporas del tejido huésped descompuesto que se encuentra en el suelo circundante. Una zoospora primaria se libera del quiste, el cual tiene forma de huso o piriforme, 2.8–5.9  $\mu\text{m}$  de longitud, y biflagelada Ayers, (1944). El flagelo



tiene dos formas: un flagelo más corto con un extremo y un flagelo largo con un látigo cervical. Cuando la zoospora alcanza la superficie del pelo radicular esta penetra en las paredes celulares. Esta etapa es conocida como la infección primaria. (Ingram & Tommerup, 1972)

### 3) **Infección cortical**

En los pelos radicales el patógeno forma el plasmodio primario. El plasmodio atraviesa por una serie de divisiones sucesivas posteriormente se forma el zoosporangio en el pelo radical y algunas veces en las células epidérmicas. Después 4-16 zoosporas secundarias son formadas por cada zoosporangio. (Ingram & Tommerup, 1972)

Las zoosporas secundarias penetran en los tejidos corticales, proceso llamado infección cortical o estado de infección secundario. Dentro de las células infectadas el patógeno prolifera estos se denominan plasmodios secundarios los cuales están asociados con síntomas como la hipertrofia, que produce la formación de hernias en las raíces. Después de varias divisiones nucleares, el plasmodio secundario contiene dos núcleos en las primeras etapas de crecimiento siendo entonces un plasmodio multinuclear. (Garber, & Aist, 1979) El plasmodio producido por germinación de las zoosporas secundarias penetra directamente en los tejidos jóvenes de la raíz; base de tallos y las raíces engrosadas y también través de heridas; el plasmodio avanza hacia las células corticales y de esta manera llega al cambium. Desde esta zona de infección, el plasmodio se propaga en todas direcciones hacia la corteza y el xilema. (Agrios, 2005)

Durante estas complejas divisiones, el patógeno además puede producir esporas de reposo y aumenta su diversidad genética; finalmente se convierte en quiste el cual permanece en el suelo como estructuras de sobrevivencia. (Agrios, 2005)

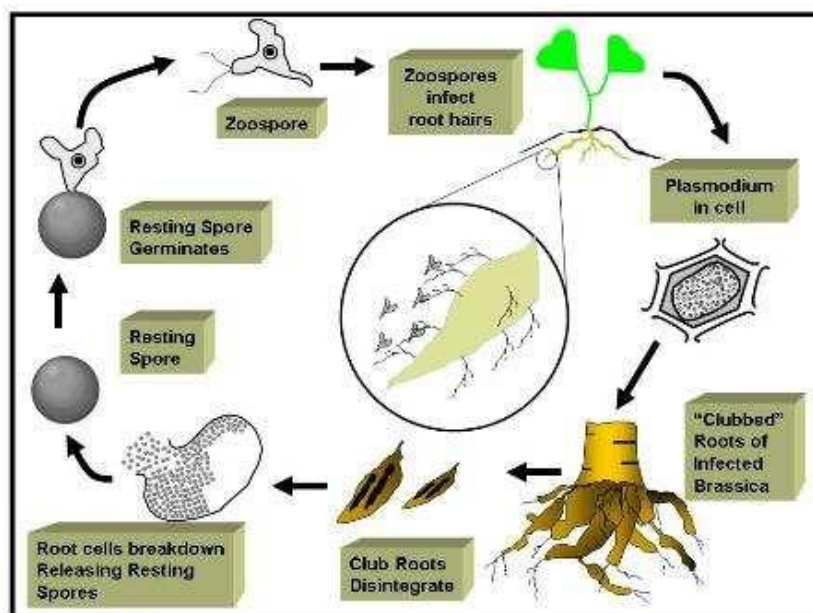


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodiophora brassicae* Woronin. (Najera, 2010)

#### e. Manejo

La mejor acción es la prevención, es decir, evitar que la enfermedad ingrese a los sitios donde no existe, ya que ninguna de las prácticas agronómicas conocidas permite controlarla eficientemente. Sin embargo el manejo responde a una serie de estrategias que incluyen la rotación de cultivos, enmiendas de calcio, en forma de calcita, dolomita, óxidos de calcio e hidróxidos de calcio y la manipulación del pH del suelo de 7,0 a 7,5. (Donald, & Porter, 2009)

El desarrollo del patógeno en las raíces del suelo y en el interior de la planta hace que sea difícil controlar, y los fungicidas no dan un control completo (Karling, 1942). El patógeno a menudo ha sido capaz de superar la resistencia después de algún tiempo. (Voorrips, 1995)

La investigación realizada por Heinrich & Stone (2014), demostró que el encalado del suelo es un método efectivo para reducir la incidencia y severidad del patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin, ya que se busca tener un pH de 7,1 en los suelos y aunque no elimina al patógeno reduce la infección de la planta.

En ensayos realizados por Velandia (1998) concluyo que bajo cualquier dosis de gallinaza descompuesta, se obtiene una reducción de las hernias de *Plasmodiophora brassicae* Wororin.

Uno de los más efectivos y naturales métodos para el control de algunos patógenos que tienen su origen en el suelo especialmente la hernia de las brassicaceas es mediante la utilización de cultivos trampa. (Bhattacharya & Dixon, 2010; Roback, 1994; Yamagashi, Yoshikawa, Ashizawa, Hida, Yoi, 1986)

#### **f. Hospederos**

El patógeno afecta principalmente a los miembros de la familia de las brassicaceas, la enfermedad se ha registrado en la col, coliflor, col china, brócoli, coles de Bruselas, nabo, el rábano, la mostaza sin embargo tiene un amplio rango de hospederos, incluyendo algunas plantas no crucíferas. (Najera, 2010)

Además la hernia de las crucíferas causa pérdidas significativas en cultivos de nabo, col, coliflor, brócoli, coles de bruselas, coles, repollo chino y rábano. Además, se puede desarrollar en malas hierbas de la misma familia que son susceptibles y pueden servir como reservorios del patógeno. (Rivera, 2007)

### **3. Variedades**

#### **a. Avenger**

Es el híbrido líder en el mercado por su amplia adaptación y rendimientos estables. La variedad Avenger ha marcado el referente tanto para la industria del congelado como para el mercado fresco. El híbrido Avenger es de planta vigorosa, con cabezas de gran peso y su uniformidad le da un beneficio para el empaque en caja para fresco y un buen aprovechamiento de pellas para el proceso. La madurez de esta variedad está comprendida entre 90-120 días. (Sakata, 2015 )

**b. Legacy**

Esta variedad de brócoli es un híbrido de excelente comportamiento, tanto para consumo fresco como para congelado. Posee cabezas grandes, pesadas, compactas y muy firmes. Pellas simétricas y de color verde oscuro además son uniformes, la planta tiene buen vigor y desarrolla pocos brotes laterales. El ciclo de cultivo está comprendido de 90-120 días. (Seminis, 2004)

**c. SK6-401 (AF-1522)**

Esta variedad de brócoli presenta algunas características como: cabeza grande y pesada, compacta de tamaño fino a medio, es una planta con el hábito de crecimiento erecto. El ciclo del cultivo es de 90-120 días después del trasplante. (Sakata, 2015 a)

**d. Coronado**

Esta variedad de brócoli es un híbrido muy vigoroso y uniforme a la cosecha, plantas compactas de porte medio con muy buena estructura foliar, presenta una cabeza muy firme, con buena estructura de las pellas, cortas y de color verde azul que es por este motivo que son ideales para la industria del congelado. (Bejo, 2013)

En el Cuadro 1. Se describen algunas características agronómicas y de resistencia a enfermedades de las variedades de brócoli en estudio.

**Cuadro 1** Distancias de siembra de las distintas variedades

Variedad	Distancia de siembra
Avenger	0,7 x 0,25m y con una densidad de plantas por hectárea de 50.000 a 55.000
Legacy	30 - 60 cm sobre hilera y 60 - 90 cm entre hilera 30.000 - 40.000 plantas/ha
SK6-401 (AF-1522)	0,7 x 0,25m con una densidad de plantas de 50.000 a 55.000 por hectárea
Coronado	0,45m x 0,45m con una densidad de plantas de 49.382 por hectárea

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR**

#### **1. Localización**

El presente trabajo de investigación se realizó en el sector denominado el mirador del troje de la Parroquia San Luis, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

#### **2. Ubicación geográfica<sup>1</sup>**

Latitud: 01° 42' 29,3''

Longitud: 78° 36' 41.5''

Altitud: 2591 msnm

#### **3. Condiciones climatológicas<sup>2</sup>**

Temperatura media anual: 13.4 °C

Humedad relativa: 73%

Precipitación media anual: 500 mm anuales

#### **4. Clasificación ecológica**

Según Holdrige citado por (Cabañas, 1984) se encuentra en el callejón interandino y corresponde a Estepa espinosa, Montano Bajo (ee MB)

---

<sup>1</sup>Información obtenida por GPS en el sitio.(2015)

<sup>2</sup> Información obtenida por la estación meteorológica de la ESPOCH

## 5. Características del suelo

### a. Características del sustrato

Como sustrato se utilizó una mezcla de:

**Cuadro 2** Composición del sustrato

Tipo	Porcentaje respecto al total
Turba (hawita)	20%
Suelo franco arenoso	60%
Pomina	10%
Humus	10%

**Elaboración:** Salcedo F (2015)

## B. MATERIALES

### 1. Material biológico

Variedades de brócoli: Avenger, Legacy, SK6-401 (AF-1522) y Coronado, inóculo natural de *Plasmodiophora brassicae* Woronin según S. Xue, T. Cao.

### 2. Materiales de campo

Azadones, rastrillo, estacas, cinta métrica, flexómetro, piola, fertilizantes, bomba de mochila (controles fitosanitarios), balanza analítica, libreta de campo, equipo de protección para aplicaciones fitosanitarias, cámara fotográfica, rótulos de identificación de tratamientos, GPS.

### 3. Materiales de oficina

Computadora, hojas de papel bond, internet, lápiz.

#### 4. **Materiales de investigación**

Se utilizó cuatro variedades diferentes para probar su resistencia a *Plasmodiophora brassicae*.

### C. **METODOLOGÍA**

#### 1. **Diseño experimental**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con 40 tratamientos y 8 repeticiones.

#### 2. **Especificaciones del campo experimental**

Número de tratamientos:	8
Número de repeticiones:	8
Número de unidades experimentales:	64

#### 3. **Tratamientos en estudio**

En el cuadro 3 se detallan los tratamientos objetos de estudio



**Cuadro 3** Tratamientos en estudio

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
T1	Variedad Avenger con inóculo
T2	Variedad Legacy con inóculo
T3	Variedad SK6 (AF1522) con inóculo
T4	Variedad Coronado con inóculo
T5	Variedad Avenger sin inóculo
T6	Variedad Legacy sin inóculo
T7	Variedad SK6 (AF1522) sin inóculo
T8	Variedad Coronado sin inóculo

**Elaboración:** Salcedo F (2015)

#### **4. Normalizar de datos**

Al realizar la prueba de Anderson Darling para probar normalidad de los datos se llegó a la conclusión de que los datos no son normales ( $p < 0,05$ ), por lo tanto se utilizó la transformación arco-seno aplicable para distribución binomial, en la que los datos están expresados como fracciones o porcentajes, en especial cuando estos presentan un rango amplio.

#### **5. Análisis estadístico**

En el cuadro 4, se presenta el esquema del análisis de varianza que se ha utilizado en el ensayo.

**Cuadro 4** Análisis de varianza (adeva) para los cultivares

<b>Fuentes de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Total	$(T \times m) - 1$	63
Tratamientos	$(T - 1)$	7
Error	$T \times (m - 1)$	56
Promedio:	U	
Coeficiente de variación:	%	

**Elaboración:** Salcedo F (2015)

## 6. Análisis funcional.

Los resultados fueron sometidos:

- 1) Al análisis de varianza (ADEVA) se usó infostat.
- 2) Se realizó la prueba de Tukey al 5% y el coeficiente de variación, se expresó en porcentaje.

## **D. MANEJO DEL ENSAYO**

### **1. Recolección de muestras para preparación del inóculo**

Las muestras fueron recolectadas de un campo de brócoli infestado por *P. brassicae* Woronin de la localidad de San Juan en la etapa fenológica de formación de pellas.

Las muestras fueron lavadas con abundante agua, posteriormente se colocaron en una solución de cloro al 5% y se sometieron a desinfección 2 veces. Luego fueron lavadas con agua destilada y se dejaron secar sobre papel.

### **2. Preparación de inóculo**

Las raíces previamente desinfectadas se cortaron y se colocaron en una licuadora a la que se le agrego 500 ml de agua destilada y se encendió a 2000 rpm durante 2 minutos según el protocolo de (Xue, Cao, Howard, Hwang & Strelkov, 2008) modificado para el efecto. Este líquido se filtró a través de gasa común de algodón en vasos de precipitación, en cada vaso de precipitación se colocó diferentes capas de gasas para tener volúmenes de filtrado, en el vaso 1 una gasa, vaso 2 dos gasas 3, vaso 3 tres gasas.

El último filtrado se obtuvo dejando reposar por 30 minutos hasta que se formó tres capas de distinta tonalidad, con cuidado se eliminó la fase superior y se colocó nuevamente 50 ml de agua destilada y se lo dejo reposar nuevamente por 30 minutos este procedimiento se realizó 3 veces . Además se prepararon tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada, estos fueron esterilizados en autoclave, y utilizados en el método de diluciones. Posteriormente se tomó una alícuota de un 1 ml de la concentración inicial, la cual fue transferida a los tubos de ensayo hasta obtener una concentración final de  $10^3$ .

### 3. Inoculación

Las raíces de las diferentes variedades, fueron sumergidas en vasos de precipitación en donde se encontraba la suspensión de  $10^3$ , a los 25 días después de la siembra. Se las dejó en esta solución por 10 minutos.

Estas plantas fueron trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 3,98L de volumen, el sustrato que se preparó para esta investigación consistió en una mezcla de los siguientes materiales indicados en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Composición del sustrato

<b>Materiales</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Observación</b>
Tierra Franco arenosa	San Andrés (Josefina)	Libre del patógeno
Turba	Hawita	Libre del patógeno
Materia orgánica	Humus	Libre del patógeno
Pomina	Espoch	Libre del patógeno

**Elaboración:** Salcedo F (2015)

El sustrato fue desinfectado mediante la aspersión con Captan (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida), para esto, el sustrato fue extendido sobre una capa de plástico y luego se cubrió con plástico transparente y se lo dejó a pleno sol por 48 horas. Después este sustrato fue traspasado a las bolsas de polietileno.

### 4. Manejo del ensayo

#### a. **Instalación del ensayo**

Para el ensayo se construyó un pequeño invernadero de dimensiones de  $81\text{m}^2$  y sobre el suelo se colocó como base dos plásticos transparentes; con la finalidad que las bolsas inoculadas con el patógeno no tengan contacto con el suelo donde se realizó el ensayo.

**b. Labores culturales**

**1) Manejo de malezas**

El manejo de malezas se realizó a los 24 días después del trasplante en forma manual y estas fueron colocadas en bolsas plásticas para su posterior eliminación por incineración.

**2) Fertilización**

La nutrición se lo realizó en base a fertilizantes solubles cada ocho días a partir del día 54 después del trasplante mediante drench con un volumen de 250 ml/planta.

**Cuadro 6.** Dosis de fertilizante

<b>Fertilizante</b>	<b>Cantidad por planta (gr/L)</b>
Nitrato de potasio	1
Nitrato de calcio	0,5
Nitrato de amonio	0,23
Sulfato de magnesio	0,5

**3) Nutrición a base de aspersiones foliares**

Para la aportación de macro y micronutrientes se utilizó productos como: rhyzum, grandfol K, microenergetic, bor, solucat 20-20-20, nitrato de magnesio y como aporte de aminoácidos se utilizó cystefol.

**4) Control fitosanitario**

Se realizó un único control a los 65 días después del trasplante para controlar poblaciones de *Plutella xylostella* mediante la utilización de clorpirifos 50 cc /50 L

## 5) Eliminación del sustrato

Luego de la utilización del sustrato se procedió a eliminar el mismo mediante la incineración

## E. EVALUACIÓN DEL ENSAYO

### 1. Severidad

Se evaluó el desarrollo de la enfermedad mediante una escala propuesta por Horiuchi y Hori y modificada por Strelkov *et al.* (2006). Dicha escala es de 0 a 3 la cual describe en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Escala de severidad

Escala	Descripción
0	No presenta hernias
1	Un par de hernias pequeñas de menos de un tercio de las raíces
2	Hernias de tamaño medio en un tercio de las raíces
3	Hernias de tamaño medio a gran tamaño en más de dos tercios de las raíces

El índice de la enfermedad (ID) se calculó utilizando la fórmula descrita a continuación:

$$ID\% = \frac{\sum(n \times 0 + n \times 1 + n \times 2 + n \times 3)}{N \times 3} \times 100\%$$

Donde:

**n** es el número de plantas en una clase

**N** es el número total de plantas en una unidad experimental

**0, 1, 2, y 3** las clases de gravedad de los síntomas.

Los datos fueron tomados cada 20 días después del trasplante.

## **2. Variación de pH**

Se realizaron evaluaciones de pH del suelo y de las raíces de cada repetición con la finalidad de observar cómo varió e influyó el pH en el desarrollo de la enfermedad.

En el caso de la muestra de suelo se utilizó un barreno el cual se introdujo a 20 cm de las bolsas de poliuretano, esta muestra fue colocada en bolsas plásticas separadas las cuales se identificaron, y fueron llevadas al laboratorio para la medición de pH.

En el caso del pH de las raíces fueron licuadas con 50 ml de agua destilada y colocadas en frascos de vidrio en las dos primeras mediciones, las tres últimas se utilizaron un extractor de jugos y el líquido resultante fue colocado en frascos para proceder a la medición del pH.

Estas evaluaciones se realizaron cada 20 después de la inoculación.

## **3. Diámetro de la pella a la cosecha**

Se midió el diámetro de la pella mediante la utilización de una cinta métrica a los 104 días después del trasplante.

## **4. Peso de la pella a la cosecha**

Se registró el peso de las pellas de los tratamientos de los 104 días después del trasplante.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. RESULTADOS

#### 1. Porcentaje de índice de enfermedad a los 20, 40, 60, 80 y 100 días después de la inoculación (ddi).

El análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 20 ddi (Cuadro 8) presentó diferencias estadísticas significativas para tratamientos.

**Cuadro 8.** Análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 20 ddi

FV	GL	SC	CM	FC	F. Tabulado		Significancia
					0,05	0,01	
Total	63	4662,25					
Tratamientos	7	1243,27	177,61	2,91	2,27	3,14	*
Error	56	3418,99	61,05				
CV%	354,56						

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

En la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de índice de enfermedad a los 20 ddi (Cuadro 9; Grafico 1) presentó tres rangos de agrupación estadística, los tratamientos sin inculo corresponden al rango "B" con un valor de severidad de 0, en los tratamientos con inculo se encuentran: Avenger en el rango "A" con una severidad de 13,22, Coronado en el rango "AB" con una severidad de 4,41 los dos tratamientos presentaron predominancia de severidad clase 1 es decir un par de hernia pequeñas de



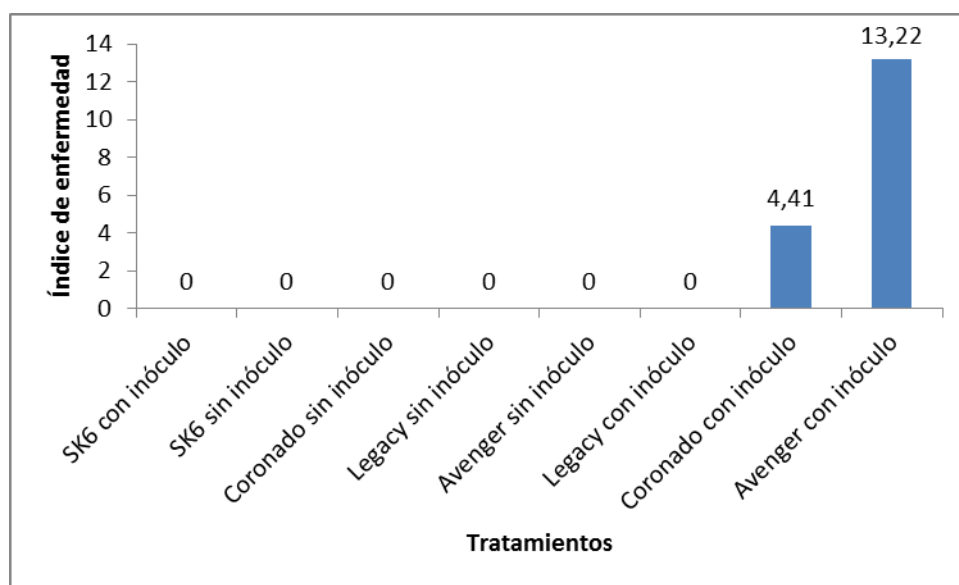
menos de un tercio de las raíces y los tratamientos Sk6 y Legacy en el rango "B" con un valor de 0 es decir sin síntomas.

**Cuadro 9.** Evaluación de índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 20 ddi.

Tratamientos	20 ddi	
SK6 con inóculo	0,00	B
SK6 sin inóculo	0,00	B
Coronado sin inóculo	0,00	B
Legacy sin inóculo	0,00	B
Avenger sin inóculo	0,00	B
Legacy con inóculo	0,00	B
Coronado con inóculo	4,41	A B
Avenger con inóculo	13,22	A

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 1.** Índice de enfermedad a los 20 días después del inóculo

El análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 40 ddi (Cuadro 10) presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos.

**Cuadro 10.** Análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 40 ddi.

FV	GL	SC	CM	FC	F. Tabulado		Significancia
					0,05	0,01	
Total	63	43615,01					
Tratamientos	7	27475,64	3925,09	13,62	2,27	3,14	**
Error	56	16139,38	288,20				
CV%	108,42						

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

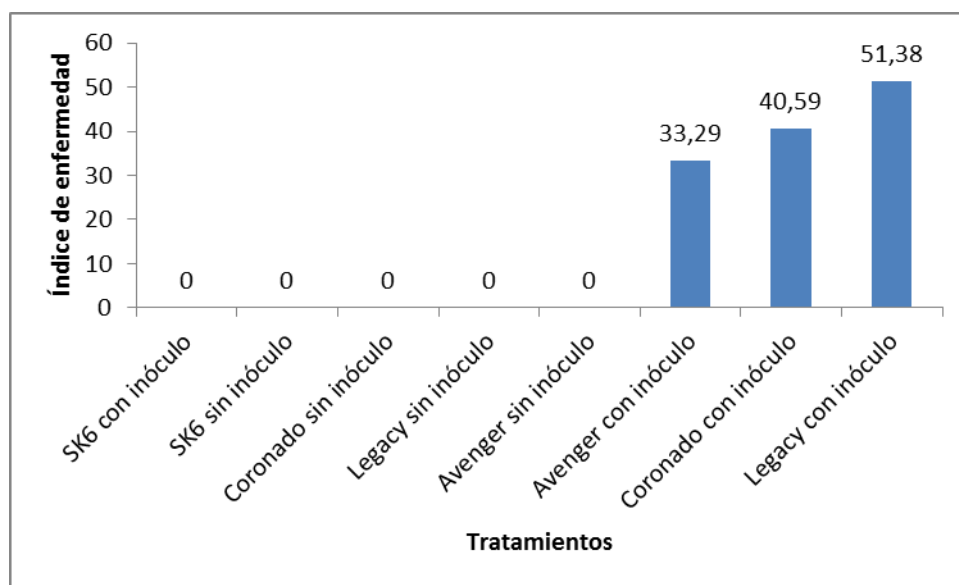
En la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de índice de enfermedad a los 40 ddi (Cuadro 11; Grafico 2) presentó dos rangos de agrupación estadística, en lo que concierne a los tratamientos sin inoculo se encuentran en el rango "B" con una severidad de 0, en los tratamientos con inoculo se encuentran: Avenger, Coronado y Legacy en el rango "A" que presentan una severidad de: 33,29; 40,59 y 51,38, respectivamente con la presencia de hernias en un tercio y en más de un tercio de las raíces y el tratamiento Sk6 con un valor de 0, sin síntomas.

**Cuadro 11.** Evaluación de índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 40 ddi.

Tratamientos	40 ddi	
SK6 con inóculo	0,00	B
SK6 sin inóculo	0,00	B
Coronado sin inóculo	0,00	B
Legacy sin inóculo	0,00	B
Avenger sin inóculo	0,00	B
Avenger con inóculo	33,29	A
Coronado con inóculo	40,59	A
Legacy con inóculo	51,38	A

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 2.** Índice de enfermedad a los 40 días después del inoculo

El análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 60 ddi (Cuadro 12) presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos.

**Cuadro 12.** Análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 60 ddi.

FV	GL	SC	CM	FC	F. Tabulado		Significancia
					0,05	0,01	
Total	63	32217,58					
Tratamientos	7	13822,44	1974,63	6,01	2,27	3,14	**
Error	56	18395,14	328,48				
CV%	165,58						

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

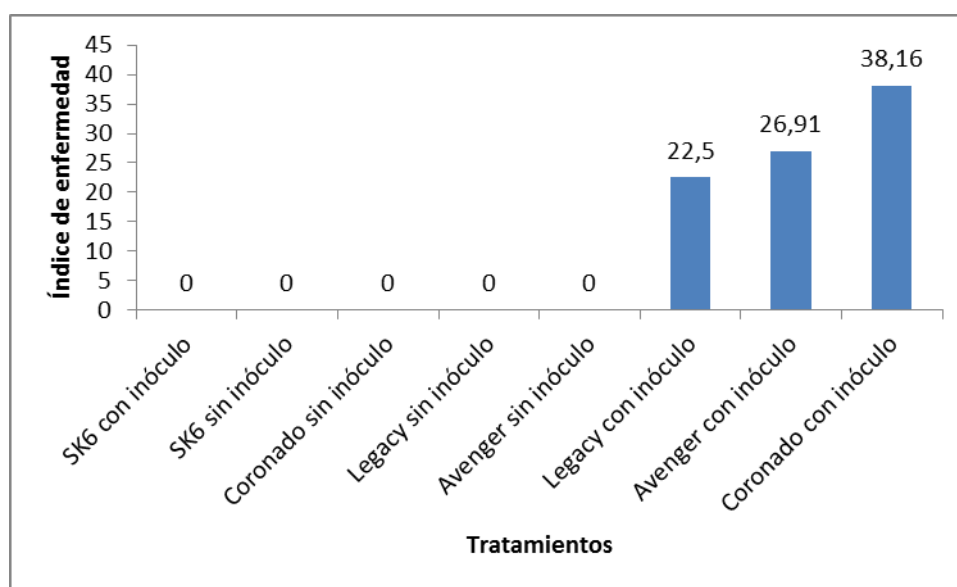
En la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de índice de enfermedad a los 60 ddi (Cuadro 13; Grafico 3) presentó tres rangos de agrupación estadística, los tratamientos sin inóculo corresponden al rango "B" con un valor de severidad de 0, en los tratamientos con inóculo se encuentran: Avenger y Legacy en el rango "AB" con una severidad de 26,91 y 22,5 respectivamente, y presencia de hernias en un tercio de las raíces Coronado en el rango "A" con una severidad de 38,16, con presencia de hernias en más de un tercio de las raíces y el tratamiento Sk6 con un valor de 0, sin síntomas.

**Cuadro 13.** Evaluación de índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 60 ddi.

Tratamientos	60 ddi	
SK6 con inóculo	0,00	B
SK6 sin inóculo	0,00	B
Coronado sin inóculo	0,00	B
Legacy sin inóculo	0,00	B
Avenger sin inóculo	0,00	B
Legacy con inóculo	22,50	A B
Avenger con inóculo	26,91	A B
Coronado con inóculo	38,16	A

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 3.** Índice de enfermedad a los 60 días después del inoculo

El análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 80 ddi (Cuadro 14) presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos.

**Cuadro 14.** Análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 80 ddi.

FV	GL	SC	CM	FC	F. Tabulado		Significancia
					0,05	0,01	
Total	63	55847,23					
Tratamientos	7	34182,33	4883,19	12,62	2,27	3,14	**
Error	56	21664,90	386,87				
CV%	112,87						

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

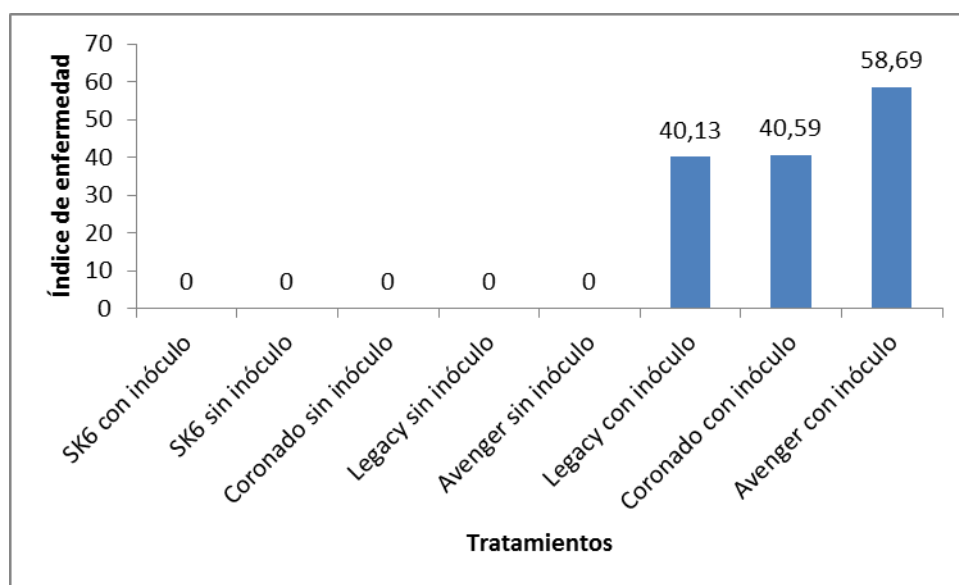
En la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de índice de enfermedad a los 80 ddi (Cuadro 15; Grafico 4) presentó dos rangos de agrupación estadística, en lo que concierne a los tratamientos sin inoculo se encuentran en el rango "B" con una severidad de 0, en los tratamientos con inoculo se encuentran: Avenger, Coronado y Legacy en el rango "A" que presentan una severidad de: 58,69; 40,59 y 40,13 respectivamente con presencia de hernias de tamaño medio en más de dos tercios de las raíces y el tratamiento Sk6 con un valor de 0, sin síntomas.

**Cuadro 15.** Evaluación de la índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 80 ddi.

Tratamientos	80 ddi	
SK6 con inóculo	0,00	B
SK6 sin inóculo	0,00	B
Coronado sin inóculo	0,00	B
Legacy sin inóculo	0,00	B
Avenger sin inóculo	0,00	B
Legacy con inóculo	40,13	A
Coronado con inóculo	40,59	A
Avenger con inóculo	58,69	A

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 4.** Índice de enfermedad a los 80 días después del inóculo

El análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 100 ddi (Cuadro 16) presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos.

**Cuadro 16.** Análisis de varianza para el porcentaje de índice de enfermedad a los 100 ddi.

FV	GL	SC	CM	FC	F. Tabulado		Significancia
					0,05	0,01	
Total	63	58643,71					
Tratamientos	7	33658,41	4808,34	10,78	2,27	3,14	**
Error	56	24985,29	446,17				
CV%	119,52						

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

En la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de índice de enfermedad a los 100 ddi (Cuadro 17; Grafico 5) presentó dos rangos de agrupación estadística, en lo que concierne a los tratamientos sin inóculo se encuentran en el rango "B" con un valor de 0, en los tratamientos con inóculo se encuentran: Avenger, Coronado y Legacy en el rango "A" que presentan una severidad de: 42,57, 46,97 y 51,84 respectivamente, con presencia de hernias de tamaño medio en más de dos tercios de las raíces y el tratamiento Sk6 con un valor de 0, sin síntomas.

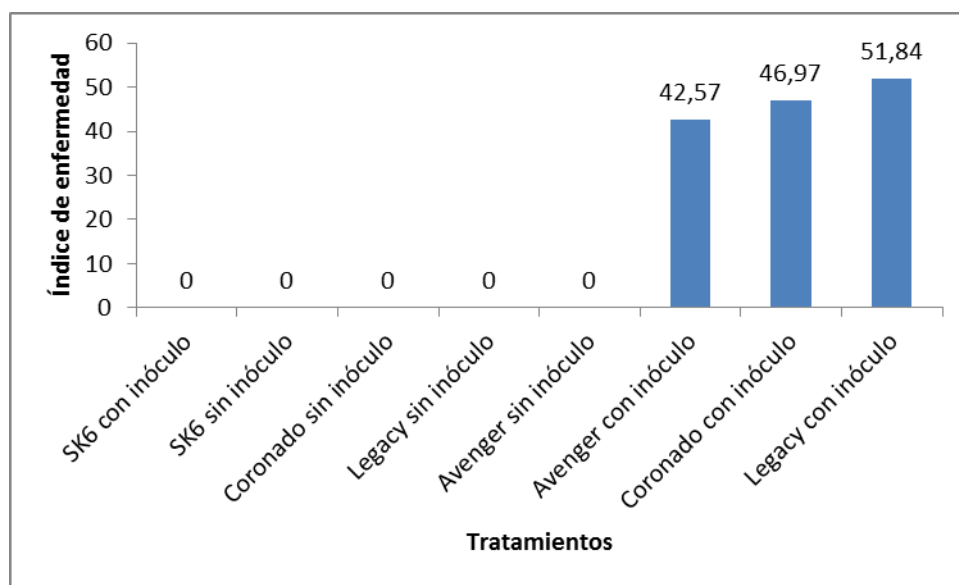


**Cuadro 17.** Evaluación de índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 100 ddi.

Tratamientos	100 ddi	
SK6 con inóculo	0,00	B
SK6 sin inóculo	0,00	B
Coronado sin inóculo	0,00	B
Legacy sin inóculo	0,00	B
Avenger sin inóculo	0,00	B
Avenger con inóculo	42,57	A
Coronado con inóculo	46,97	A
Legacy con inóculo	51,84	A

Medias con una letra común no son significativas según la prueba de Tukey ( $p>0,05$ ).

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 5.** Índice de enfermedad a los 100 días después del inóculo

**Cuadro 18.** Cuadro resumen de índice de enfermedad en las distintas variedades de brócoli a los 20, 40, 60, 80 y 100 ddi.

Tratamientos	20ddt			40ddt			60ddt			80ddt			100ddt		
SK6 con inóculo	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B	42,57		B
SK6 sin inóculo	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B	51,84		B
Coronado sin inóculo	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B	46,97		B
Legacy sin inóculo	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B
Avenger sin inóculo	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B	0,00		B
Legacy con inóculo	0,00		B	51,38	A		22,50	A	B	40,13	A		51,84	A	
Coronado con inóculo	4,41	A	B	40,59	A		38,16	A	B	40,59	A		46,97	A	
Avenger con inóculo	13,22	A		33,29	A		26,91	A		58,69	A		42,57	A	

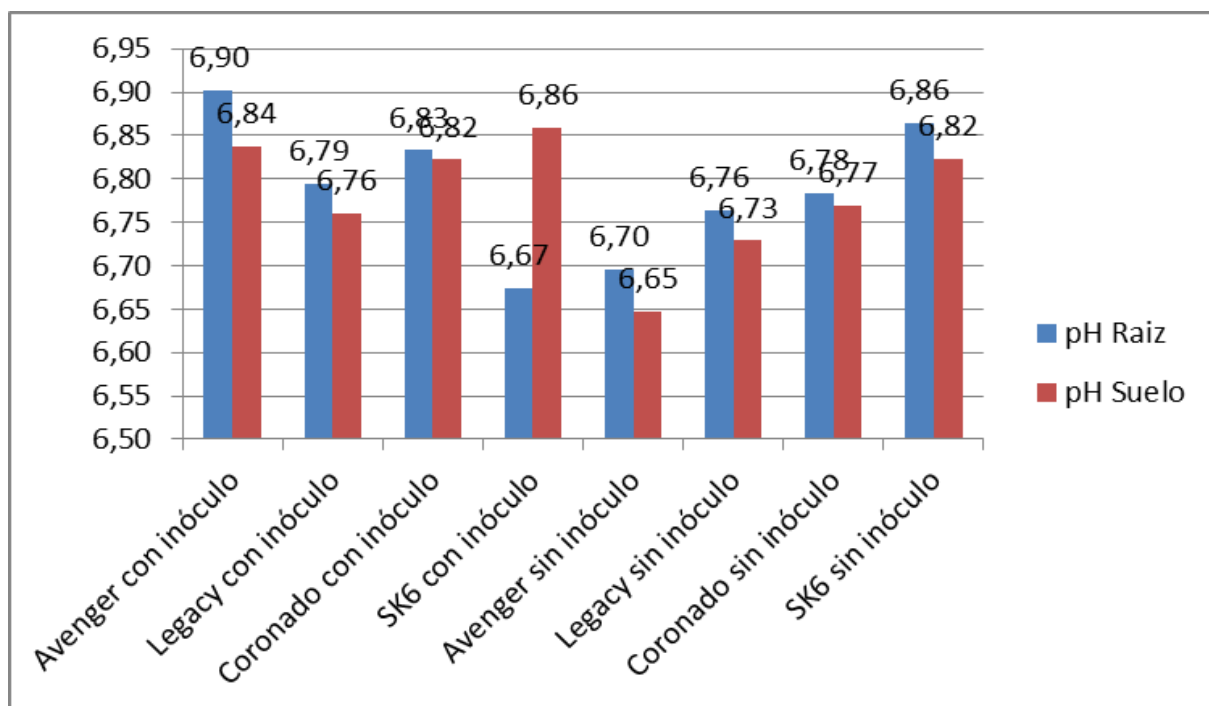
**Elaboración:** Salcedo F (2016)

2. **Valor de pH del suelo y las raíces en los diferentes tratamientos durante el desarrollo del ensayo.**

**Cuadro 19.** Promedio de los valores de pH en la raíz y suelo

Tratamientos	pH	
	Raíz	Suelo
Avenger con inóculo	7,22	6,82
Legacy con inóculo	6,75	6,85
Coronado con inóculo	6,90	6,80
SK6 con inóculo	6,97	6,92
Avenger sin inóculo	6,79	6,74
Legacy sin inóculo	6,76	6,74
Coronado sin inóculo	6,90	6,81
SK6 sin inóculo	6,94	6,80

**Elaboración:** Salcedo F (2016)



**Gráfico 6.** Promedio de los valores de pH para cada tratamiento.

**Cuadro 20.** Evaluación de componentes del rendimiento agrícola en las cuatro variedades de brócoli (Avenger, Legacy, Coronado y SK6) inoculadas con *P. Brassicae* y sin inóculo.

Tratamiento	Plantas con inoculo		Plantas sin inoculo		% de pérdida de peso
	Diámetro (cm.)	Peso (gr.)	Diámetro (cm.)	Peso (gr.)	
Avenger	9,3	35	12,9	54,5	35,78
Legacy	9	37,5	13,1	56,4	33,49
Coronado	8,6	32,1	15,1	101,5	68,34
SK6	7,6	35,8	11,6	39,9	10,36

**Elaboración:** Salcedo F (2016)

## B. DISCUSION

### 1. Severidad a los 20 días después del inóculo

A los 20 ddi las variedades Avenger con inóculo (ci) y Coronado (ci) presentaron una severidad de 13,22 y 4,41 respectivamente los demás tratamientos tuvieron una severidad de 0, lo que indica una presencia baja de la enfermedad. En el caso de las variedades Coronado (ci) y Avenger (ci) mostraron un ligero engrosamiento de las raíces, que se debería al inicio de la formación de hernias de acuerdo a la etapa de infección del patógeno (Voorrips & Kanne, 1997; Najera, 2010; Agrios, 2005; Dixon, 2006). Sin embargo la infección fue mínima debido a que las hernias producidas por la enfermedad fueron fácilmente visible dentro de las 5 a 6 semanas después de la inoculación (Sharma, et al. 2011).

También los tratamientos Avenger (ci), Legacy (ci), Coronado (ci) y Sk6 (ci), presentaron síntomas de amarillamiento en las hojas inferiores y un color verde pálido en las superiores, cuya sintomatología se presenta en las etapas iniciales de crecimiento una vez que el patógeno inicia el proceso de patogénesis en las plantas de brócoli (Devos et al., 2005; Agrios, 2005; Maldonado, 2009; Walker, 1965) a diferencia de las plantas no inoculadas presentaron un desarrollo normal, a pesar de esto las variedades Avenger y Sk6 mostraron un mejor desarrollo en comparación de las variedades Coronado y Legacy.

### 2. Severidad a los 40 días después del inóculo

A los 40 días después de la inoculación se observó un incremento en el grado de infección en comparación a los 20 días. En los tratamientos de las variedades Avenger (ci), Legacy (ci) y Coronado (ci), presentaron una severidad de 33, 29; 51,38 y 40,59 respectivamente, estas plantas presentaron el comienzo de la segunda fase

del ciclo de vida del patógeno como es la producción de síntomas de hiperplasia e hipertrofia en las células de las raíces lo que consecuentemente induce a un crecimiento anormal de las mismas y la formación de las hernias (Ingram, D. & Tommerup, 1972; Cao, et al., 2007; Friberg, et al., 2008; Karling, 1968; Voorrips, 1995). Asociado a estos síntomas las plantas presentaban marchitamiento diurno y en la noche recuperaban su turgencia, esto se debe tanto a la temperatura y al daño de las raíces que afecta al balance hídrico de las plantas ya que el patógeno utiliza moléculas de señalización para redistribuir los asimilados del ápice de la planta a la raíz para garantizar su propia nutrición (Evans & Scholes, 1995; Gravot, et al., 2012; Agrios, 2005). A diferencia de los tratamientos sin inóculo los cuales no presentaron estos síntomas, respuesta que también se observó en la variedad SK6 (ci) con una severidad de 0 en los mismos, este comportamiento se puede explicar debido a la genética de esta variedad la cual presentaría cierto grado de resistencia, algunas investigaciones indican que uno y tres genes principales y un locus de carácter cuantitativo (QTL) están involucrados en conferir resistencia a *P. brassicae* Woronin. Los principales genes detectados fueron *CRa*, *CRb*, *Crr3*, *CRR1*, *Crr2*, (Matsumoto, et al., 1998; Piao, et al., 2004; Hirai, 2006; Suwabe, et al., 2003, 2006). Además, un QTL adicional fue identificado por Suwabe, et al., (2006) denominado *CRR4*. Actualmente, un total de ocho sitios de resistencia han sido asignados al genoma A; a su vez en el genoma C han revelado que la resistencia a *P. brassicae* Woronin en *B. oleracea* es cuantitativa y bajo orden poligénico por uno o dos grandes QLTs y algunos QLTs de menor efecto (Figdore, et al., 1993; Grandclément & Thomas, 1996; Landry, et al., 1992; Moriguchi et al., 1999; Nomura, et al., 2005; Rocherieux, et al., 2004; Voorrips, et al., 1997)

### **3. Severidad a los 60 días después del inóculo**

A los 60 días se pudo observar la presencia de hernias grado 1, 2 y 3, en las plantas de las variedades Avenger, Legacy y Coronado (ci), las cuales presentaron una severidad

de 26,91; 22,50 y 38,16 respectivamente en los tratamientos sin inóculo la severidad se mantuvo en 0 al igual que en el tratamiento SK6 (ci) lo que podría demostrar una resistencia moderada a *P. brassicae* Woronin. La principal diferencia que se pudo observar entre los tratamientos fue la presencia de síntomas de clorosis en las hojas de las plantas inoculadas a comparación de las no inoculadas, las cuales se mantuvieron sanas durante el experimento.

#### **4. Severidad a los 80 y 100 días después del inóculo**

A los 80 y 100 días se observó un incremento de plantas que presentaban hernias de tamaño medio a grande en más de los dos tercios de la raíz, esto se debe a que las zoosporas secundarias del patógeno pueden penetrar en el tejido cortical, en este caso las células infectadas por el patógeno desarrollaron el plasmodio secundario el cual proliferó, esto está asociado con la hipertrofia celular seguido de la formación de las hernias en las plantas infectadas con la enfermedad (Ingram, & Tommerup, 1972). Tal es el caso de las variedades Avenger (ci), Legacy (ci) y Coronado (ci) las cuales a los 80 días presentaron una severidad de 58,69; 40,13 y 40,59 respectivamente y a los 100 días una severidad de 42,57; 51,84 y 46,97 respectivamente los tratamientos sin inóculo se mantuvieron con una severidad de 0 y a pesar que el tratamiento SK6 también fue inoculado se observó la ausencia de hernias. Sin embargo estas plantas presentaron alteraciones fisiológicas debido a que existió un retraso normal del desarrollo en su altura. Este comportamiento podría explicarse ya que en varias investigaciones sugieren que en la infección primaria y secundaria del patógeno tanto en variedades resistentes y susceptibles se debe a la degradación de las paredes celulares secundarias y del xilema, siendo inferior la degradación en variedades resistentes. (López, 1995; Donald, et al., 2008)

## 5. pH

El pH es un factor importante en el desarrollo del patógeno *Plasmodiophora brassicaea* Woronin ya que en pH alcalinos reducen el daño del protozoo (Voorrips, 1995; Myers & Campbell, 1985; Takahashi, 1994). En el cuadro 18 y gráfico 6 se puede observar que en esta investigación los diferentes tratamientos se desarrollaron en un pH neutro, según Myers & Campbell, (1985), quien observo el desarrollo de la enfermedad bajo distintos niveles de pH, encontró que el porcentaje de hernias fue mayor en pH comprendidos entre 5,4 - 7,1 y la infección es reducida pero no eliminada en pH que van de 7,3-8,0; esto se contrasta con lo mencionado por Jaramillo & Lobo, (1983) y Velandia, (1992); en donde indican que en un pH de 7,2 la enfermedad no progresa.

## 6. Peso y diámetro

Al momento de la cosecha se observó que el peso y el diámetro de las pellas tanto en (si) como en (ci) fueron menores a los observados en campo (cuadro 19). Según Equaquímica el peso promedio de una pella sana varía desde 400 a 1000 gramos. Esto podría explicarse a que algunos factores afectarían en el normal desarrollo de las plantas ya que el brócoli es un cultivo que normalmente se siembra y desarrolla en campo abierto; al encontrarse bajo condiciones distintas pueden afectar el desarrollo de las plantas como es el mantenerlas contenidas en recipientes ya que el tamaño del recipiente influye directamente en el desarrollo (Duval & NeSmith, 1998; Cantliffe, 1993). Además, las plantas pueden presentar cambios morfológicos y fisiológicos por una baja intensidad luminosa la cual provoca una disminución en las tasas fotosintéticas de las cuatro variedades y por una reducción del volumen de enraizamiento ya que aumenta competencia por espacio y oxígeno, lo que afecta a la absorción de agua y nutrientes, contenido de clorofila en las hojas, fotosíntesis,



acumulación de biomasa y rendimiento (Peterson, et al., 1991; Bilderback & Fonteno, 1987).

Además, existieron diferencias en la formación de la pella entre las plantas infectadas con y sin *Plasmodiophora brassicae* Woronin. En las primeras se observó una pérdida en la compactación de la inflorescencia provocado por la apertura prematura de la misma (Zambrano, *et al.*, 2005). Por este motivo, las pellas perdieron su valor comercial, por la deformación y a un acelerado proceso en la floración. Sin embargo, en los tratamientos (si) y en los de la variedad SK6 (ci) hubo una compactación normal de la inflorescencia, lo que se observa en un diámetro y peso mayor.

La pérdida de peso de las variedades con inóculo fue: Avenger (35,78%), Legacy (33,49) y Coronado (68,34) fue mayor en relación a la variedad SK6 (10,36)10,36 respectivamente.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Se desarrolló un protocolo de inoculación que permitió un progreso uniforme de los síntomas causados por *P. brassicae* Woronin en las variedades de brócoli: Avenger, Legacy y Coronado .
2. La variedad SK6 fue el más resistente pues mostro el menor índice de severidad (0%) y no presentó la formación de hernias durante el desarrollo del ensayo, demostrando resistencia al patógeno.
3. Se observó una perdida en los valores de los componentes del rendimiento en las cuatro variedades de brócoli.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda utilizar el protocolo de inoculación provado en la presente investigación.
2. Se aconseja el trasplante la variedad SK6 en suelos infectados con el patógeno *Plasmodiophora brassicae* Woronin como una medida para el control, ya que demostro resistencia al patógeno.
3. Se sugiere realizar investigaciones de la resistencia de la variedad SK6 al patógeno bajo una diferentes concentración de inóculo.

## VIII. RESUMEN

La presente investigación propone: evaluar la resistencia de cuatro variedades de brócoli (Avenger, Legacy, Coronado, SK6) a *Plasmodiophora brassicae* Woronin, en la provincia de Chimborazo para desarrollar en el futuro alternativas de manejo eficientes. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con ocho tratamientos y ocho repeticiones, tratamiento 1 Aveger con inóculo, tratamiento 2 Legacy con inóculo, tratamiento 3 Coronado con inóculo, tratamiento 4 SK6 con inóculo, tratamiento 5 Aveger sin inóculo, tratamiento 6 Legacy sin inóculo, tratamiento 7 Coronado sin inóculo y tratamiento 8 SK6 sin inóculo, a los 25 días después de la siembra se realizó el inóculo con el patógeno *Plasmodiophora brassicae*, Woronin. Las mismas que fueron trasplantadas en fundas de polietileno, se evaluó el desarrollo de la enfermedad cada 20 días después del trasplante mediante una escala propuesta por Horiuchi y Hori, modificada por Strelkov donde se calculó el índice de la enfermedad en porcentaje y correspondía a la presencia de hernias en las raíces, también se evaluó el pH tanto del suelo como de la raíz. Los tratamientos sin inóculo tuvieron un índice de enfermedad de 0%, los tratamientos con inoculo: Avenger, Legacy y Coronado presentaron diferente porcentaje de índice de enfermedad en las diferentes tomas de datos, siendo el mayor a los 100 días después del inoculo: 42,57%; 51,84%; 46,97% respectivamente, presentando hernias en más de dos tercios de las raíces, el tratamiento SK6 con inoculo presento un índice de 0% durante todo el ensayo indicando la ausencia de síntomas es decir de hernias, el pH se mantuvo en valores neutros durante todo el ensayo con lo cual no fue el óptimo pero tampoco fue un limitante para el desarrollo de la enfermedad mediante los resultados se concluye que la variedad SK6 presenta resistencia al patógeno *Plasmodiophora brassicae*, Woronin.

Palabras clave: variedades de brócoli, modificación genética, severidad, índice de enfermedad

**Por: Fabián Salcedo**



## IX. SUMMARY

This research aims to: evaluate the resistance of four varieties of broccoli (avenger, Legacy, Coronado, SK6) to *Plasmodiophora brassicae* Woronin in the province of Chimborazo to develop in the future of efficient management alternatives. A completely randomized design was used with eight treatments and eight repetitions, Treatment 1 Avenger inoculum, treatment 2 Legacy inoculum, treatment 3 Coronado inoculum, treatment 4 SK6 inoculum, treatment 5 Avenger without inoculum, treatment 6 Legacy without inoculum, treatment 7 Coronado without inoculum and treatment 8 SK6 without inoculum, at 25 days after sowing the inoculum was performed with the pathogen *Plasmodiophora brassicacea*, Woronin. The same ones that were transplanted into polyethylene bags, the development of the disease was evaluated every 20 days after transplantation using a scale proposed by Hourichi and Hori, as amended by Strelkov where the rate of the disease was calculated in percentage and corresponded to the presence of hernias in the roots, also the pH of the both soil and root were evaluated. Treatments without inoculum had an index of 0% disease, treatments with inoculum: Avenger, Legacy and Coronado had different percentage rate of disease in different data collections, being greater than 100 days after the inoculum: 42,57%; 51,84%; 46,97%, respectively, presenting hernias in more than two thirds of the roots, treatment SK6 with inoculum presented an index of 0% throughout the test indicating the absence of symptoms, it means hernias, the pH was maintained at neutral values throughout the test so that was not the optimal but it was not a limiting factor for the development of the disease by the results, it is concluded that the SK6 variety is resistant to the pathogen *Plasmodiophora brassicae*, Woronin.

Keywords: broccoli varieties, genetic modification, severity, illness index.



## X. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology* (5ta .ed.). San Diego: Academic Press, p. 922.  
Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015.  
Retrieved from: <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.019>
- Alicante. (2013). *Glosarios*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015.  
Retrieved from: <http://glosarios.servidor-alicante.com/glosarios>
- Ayers, G. W. (1944). *Studies on the life history of the club root organism, Plasmodiophora brassicae*. Canadian Journal of Research, 1944. 22(4), pp.143-149 .
- Bejo. (2013). *Coronado*. Recuperado del: 17 de Diciembre del 2015.  
Retrieved from: <http://semillas-bejo-agrifo.webnode.com.co/products/brocolo-hibrido-coronado-f1/>
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J. L. (2004). *Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners*. Current Opinion in Plant Biology. Canada.
- Bhattacharya, I., & Dixon, G. R. (2010). *Management of clubroot disease (Plasmodiophora brassicae) of brassicas using trap cropping techniques*. In Acta Horticulturae (pp. 157–164). International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium. Recuperado del: 20 de Diciembre del 2015.  
Retrieved from: <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.867.20>
- Bilderback, T. E., & Fonteno, W. C. (1987). *Effects of container geometry and media physical properties on air and water volumes in containers*. Journal of Environmental Horticulture, 5(4), 180–182.
- Cantliffe, D. J. (1993). *Pre- and postharvest practices for improved vegetable transplant quality*. HortTechnology, 3(4), 3–6.
- Cao, T., Tewari, J., & Strelkov, S. E. (2007). *Molecular detection of Plasmodiophora brassicae, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil*. Plant Disease, 91(1), 80–87.
- Castillo, J., & Guerrero, O. (2008). *Efecto de controladores biológicos sobre la hernia de las crucíferas en Tabio, Cundinamarca*. Revista Inventum, (5), 30–40.
- Cifuentes, G. (2006). *Modúlo de fitopatología I*. UNAD. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from:

[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/Contenido\\_Curso\\_de\\_Fitopatologia.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/Contenido_Curso_de_Fitopatologia.pdf)

- Dao, F., & Holmquest, O. (1962). *La hernia de las crucíferas (Plasmodiophora brassicae Woronin) en Venezuela. Agronomía Tropical (Venezuela)*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRINVE.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008026>
- Dimitrova, L. (2009). *Notas genética de la resistencia a las enfermedades en plantas hortícolas*. Temas de Ciencia Y Tecnología, 41–44.
- Dixon, G. R. (2006). *The biology of Plasmodiophora brassicae wor. - a review of recent advances*. In Acta Horticulturae (pp. 271–282). International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium. Recuperado del: 21 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.706.32>
- Dixon, G. R. (2009). *The occurrence and economic impact of Plasmodiophora brassicae and clubroot disease*. Journal of Plant Growth Regulation, 28(3), 194–202.
- Donald, C., & Porter, I. (2009). *Integrated control of clubroot*. Journal of Plant Growth Regulation, 28(3), 289–303.
- Donald, E. C., Jaudzems, G., & Porter, I. J. (2008). *Pathology of cortical invasion by Plasmodiophora brassicae in clubroot resistant and susceptible Brassica oleracea hosts*. Plant Pathology, 57(2), 201–209.
- Duval, J., & NeSmith, D. (1998). *The effect of container size*. HortTechnology, 495–498. Canada.
- Figdore, S. S., Ferreira, M. E., Slocum, M. K., & Williams, P. H. (1993). *Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in Brassica oleracea L. Euphytica*, 69(1), 33–44.
- Flor, H. H. (1955). *Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications*. Phytopathology, 45, 680–685.
- Friberg, H., Lagerlöf, J., Hedlund, K., & Rämert, B. (2008). *Effect of earthworms and incorporation of grass on Plasmodiophora brassicae*. Pedobiologia, 52(1), 29–39.

- Friberg, H., Lagerlöf, J., & Rämert, B. (2005). *Germination of Plasmodiophora brassicae resting spores stimulated by a non-host plant*. European Journal of Plant Pathology, 113(3), 275–281.
- Garber, R. C., & Aist, J. R. (1979). *The ultrastructure of mitosis in Plasmodiophora brassicae (Plasmodiophorales)*. Journal of Cell Science, 40, 89–110.
- Gibbs, J. (1931). *Dissemination of club root in the dung of farm stock*. NZJ Agric, 42, 193–198.
- Gonzales, M. (2015). *Evaluación*. Recuperado del: 02 de Febrero del 2016. Retrieved from: <http://docplayer.es/3002153-La-evaluacion-mercedes-rodriguez-gonzalez-meilyn-ramos-rodriguez.html>
- Grandclément, C., & Thomas, G. (1996). *Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to Plasmodiophora brassicae Woron in Brassica oleracea L*. Theoretical and Applied Genetics, 93(1), 86–90.
- Gravot, A., Deleu, C., Wagner, G., Lariagon, C., Lugan, R., Todd, C., & Manzanares-Dauleux, M. J. (2012). *Arginase induction represses gall development during clubroot infection in arabidopsis*. Plant and Cell Physiology, 53(5), 901–911.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., & Park, S. W. (2012). *Plant disease resistance genes: current status and future directions*. Physiological and Molecular Plant Pathology. New york.
- Heinrich, A., & Stone, A. (2014). *Clubroot ( Plasmodiophora brassicae ) control strategies on brassicas*, 2(541), 1–20. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from [http://horticulture.oregonstate.edu/system/files/Clubroot final report%20Heinrich Stone .pdf](http://horticulture.oregonstate.edu/system/files/Clubroot%20final%20report.pdf)
- Hernández, Y. (2010). *Defensa de las plantas a los fitopatógenos*. Ucv, Agronomía, 67. Venezuela.
- Herrera, E. (2013). *¿Cómo medir el nivel de daño de una enfermedad en las plantas?* Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://nicxongarcia.blogspot.com/2013/02/tarea-3.html>
- Hirai, M. (2006). *Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica Crops*. Breeding Science, 56(3), 223–229.



- Ingram, D. S., & Tommerup, I. C. (1972). *The Life History of Plasmodiophora brassicae* Woron. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Canada.
- Jaramillo, J. & Lobo, M. (1983). *Manual de hortalizas*. Instituto Colombiano Agropecuario. ICA. Bogotá. *Manual de Asistencia Técnica*, 28.
- Karling, J. S. (1942). *The Plasmodiophorales; including a complete host index bibliography* . 001497705 . New York: The author.
- Karling, J. S. (1968). *The Plasmodiophorales: including a complete host index, bibliography, and a description of diseases caused by species of this order* (2nd comple). New York: Hafner.
- Landry, B. S., Hubert, N., Crete, R., Chang, M. S., Lincoln, S. E., & Etoh, T. (1992). *A genetic map for Brassica oleracea based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of Plasmodiophora brassicae (Woronin)*. *Genome*, 35(3), 409–420.
- López, M. (1995). *Evaluación de métodos de control de la hernia de la crucíferas (Plasmodiophora brassicae) en el cultivo del brócoli (Brassica oleracea var. Itálica) en Patzicia, Chimaltenango*. USAC.
- Maccario, B. (1989). *Teoría y práctica de la evaluación de las actividades físicas y deportivas* (Lindium). Barcelona.
- Macfarlane, I. (1970). *Germination of resting spores of Plasmodiophora brassicae*. Transactions of the British Mycological Society. Inglaterra.
- Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca. (2012). *Brócoli*. Boletín Situacional, 1–5. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/BoletinesCultivos/Brocoli.pdf>
- Maldonado, H. (2009). *Presentación sobre el cultivo de brócoli para los agricultores y procesadores del Ecuador*. California, USA. AsgrowVegetables Seeds.
- Matsumoto, E., Yasui, C., Ohi, M., & Tsukada, M. (1998). *Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis)*. *Euphytica*, 104(2), 79–86.

- Myers, D. F., & Campbell, R. N. (1985). *Lime and the control of clubroot of crucifers: effects of ph, calcium, magnesium and their interactions*. Phytopathology. California.
- Naiki, K. (1987). *Life cycle and control of Plasmodiophora brassicae, causing clubroot disease of cruciferous plants*. *Soil Microorganisms*, 29, 23–37.
- Najera, H. (2010). *Plasmodiophora brassicae*. Universidad Rafael Landívar. Recuperado del: 20 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://myslide.es/documents/trabajo-investigacion-plasmodiophora-brassicae.html>
- Nomura, K., Minegishi, Y., Kimizuka-Takagi, C., Fujioka, T., Moriguchi, K., Shishido, R., & Ikehashi, H. (2005). *Evaluation of F2 and F3 plants introgressed with QTLs for clubroot resistance in cabbage developed by using SCAR markers*. *Plant Breeding*, 124(4), 371–375.
- Peterson, T., Reinsel, M., & Krizek, D. (1991). *Tomato (Lycopersicon esculentum Mill., cv. 'Better Bush') plant response to root restriction*. *Journal of Experimental Botany*, 42(243), 1241–1249.
- Piao, Z. Y., Deng, Y. Q., Choi, S. R., Park, Y. J., & Lim, Y. P. (2004). *SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to Plasmodiophora brassicae in Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1458–1465.
- Pirillo, E. (2009). *Métodos de mejoramiento de especies*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://www.librogen.com.ar/mejoramiento.htm>
- Real Academia Española. (2007). *Diccionario manual de la lengua española*. Recuperado del: 03 de Febrero del 2016. Retrieved from: <http://es.thefreedictionary.com/evaluaci%c3%b3n>
- Rivera, F. (2007). *Manejo del cultivo de brócoli (brassica oleracea var. italica) en la empresa alimentos congelados, s.a. (alcosa)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_2363.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2363.pdf)
- Roback, J. (1994). *New possibility to control of cluroot (Plasmodiophora brassicae) at integrated crop system*. Recuperado del: 20 de Diciembre del 2015. Retrieved from: [http://www.inhort.pl/files/program\\_wieloletni/wykaz\\_publicacji/obszar1/New](http://www.inhort.pl/files/program_wieloletni/wykaz_publicacji/obszar1/New)

possibility to control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) at integrated crop system.pdf

- Rocherieux, J., Glory, P., Giboulot, A., Boury, S., Barbeyron, G., Thomas, G., & Manzanares-Dauleux, M. J. (2004). *Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in Brassica oleracea*. Theoretical and Applied Genetics, 108(8), 1555–1563.
- Sakata. (2015). *Avenger*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://www.sakata.com.mx/es/avenger.html>
- Sakata. (2015 a). *Brocoli*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://www.sakata.com.br/cas/productos/hortalizas/brasicas/brocoli>
- Seminis. (2004). *Legacy*. Recuperado del: 15 de Diciembre del 2015. Retrieved from: <http://www.seminis.com/global/cl/products/Pages/BrocoliLegacy.aspx>
- Sharma, K., Gossen, B. D., & McDonald, M. R. (2011). *Effect of temperature on primary infection by Plasmodiophora brassicae and initiation of clubroot symptoms*. Plant Pathology, 60(5), 830–838.
- Suwabe, K., Tsukazaki, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Fujimura, M., Nunome, T., & Hirai, M. (2003). *Identification of two loci for resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicae Woronin) in Brassica rapa L. Theoretical and Applied Genetics*, 107(6), 997–1002.
- Suwabe, K., Tsukazaki, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Kondo, M., Fujimura, M., & Matsumoto, S. (2006). *Simple sequence repeat-Based comparative genomics between Brassica rapa and Arabidopsis thaliana: the genetic origin of clubroot resistance*. Genetics, 173(1), 309–319.
- Takahashi, K. (1994). *Influences of some environmental factors on the viability of resting spores of Plasmodiophora brassicae Wor. incubated in sterile soil*. Japanese Journal of Phytopathology, 60(6), 658–666.
- Van Der Plank, J. E. (1968). *Disease resistance in plants* . 001506743. New York: Academic Press.
- Velandia, J. (1992). *Evaluación de cinco niveles de cal apagada en el control de Plasmodiophora brassicae en repollo bola verde*. Informe Anual de Actividades, Sección de Hortalizas, 7–11.

- Velandia, J. (1998). *Evaluación de la gallinaza en el control de Plasmodiophora brassicae en repollo* Poultry manure evaluation in the control of *Plasmodiophora brassicae* in cabbage. *Agronomía Colombiana*, Vol 15, Iss 1, pp 1-6 (1998).
- Voorrips, R. E. (1995). *Plasmodiophora brassicae* : aspects of pathogenesis and resistance in *Brassica oleracea*. *Euphytica*, 83(2), 139–146.
- Voorrips, R. E., Jongerius, M. C., & Kanne, H. J. (1997). *Mapping of two genes for resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicae) in a population of doubled haploid lines of Brassica oleracea by means of RFLP and AFLP markers*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(1), 75–82.
- Voorrips, R. E., & Kanne, H. J. (1997). *Genetic analysis of resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicae) in Brassica oleracea. I. Analysis of symptom grades*. *Euphytica*, 93(1), 31–39.
- Walker, J. C. (1965). *Disease resistance in the vegetable crops. III*. *The Botanical Review*, 31(3), 331–380.
- Wallenhammar, A. (1996). *Prevalence of Plasmodiophora brassicae in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels*. *Plant Pathology*, 1996. 45(4), 710-719.
- White, J. G. (1979). *Observations on suppression of clubroot by artificial or natural heating of soil*. (S. T. Buczacki, Ed.), *Transactions of the British Mycological Society*, 1979, Vol.73(2), pp.271-275.
- Xue, S., Cao, T., Howard, R. J., Hwang, S. F., & Strelkov, S. E. (2008). *Isolation and variation in virulence of single-spore isolates of Plasmodiophora brassicae from Canada*. *Plant Disease*, 92(3), 456–462.
- Yamagashi, H., Yoshikawa, H., Ashizawa, M., Hida, K., Yoi, S. (1986). *Effects of resistance plants as catch crop on the reduction of resting spores of clubroot (Plasmodiophora brassicae Woron.) in soil*. *Journal of the Japanese Society for. Poland*
- Yano, S., Tanaka, S., Kameya, M., & Katumoto, K. (1991). *Relation of Ca<sup>2+</sup> efflux to germination of resting spores of clubroot fungus*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture-Yamaguchi University (Japan)*.
- Zambrano, C & García, A. (2005). *Plasmodiophora brassicae*. *INIA Divulga. INIA*, 56. Perú.

## **XI. ANEXOS**

**Anexo 1.** Severidad presentada en el ensayo mediante la escala propuesta por Horiuchi y Hori y modificada por Strelkov et al. (2006), tratamientos sin inóculo.

Tratamientos		Severidad				
		20ddi	40ddi	60ddi	80ddi	100ddi
Averger	A1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Legacy	L1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

	L7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Coronado	C1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SK6	S1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Anexo 2.** Datos normalizados de severidad, tratamientos sin inoculo.

Tratamientos		Severidad				
		20ddi	40ddi	60ddi	80ddi	100ddi
Avenger	A1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	A8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Legacy	L1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	L8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Coronado	C1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	C8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SK6	S1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



**Anexo 3.** Severidad presentada en el ensayo mediante la escala propuesta por Horiuchi y Hori y modificada por Strelkov et al. (2006), tratamientos con inóculo.

Tratamientos		Severidad				
		20ddi	40ddi	60ddi	80ddi	100ddi
Avenger	A1	33,33	33,33	0,00	66,67	66,67
	A2	0,00	33,33	33,33	33,33	66,67
	A3	33,33	33,33	66,67	0,00	33,33
	A4	0,00	33,33	66,67	100,00	33,33
	A5	33,33	33,33	33,33	100,00	33,33
	A6	0,00	33,33	0,00	66,67	33,33
	A7	0,00	66,67	33,33	66,67	0,00
	A8	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00
Legacy	L1	0,00	33,33	66,67	33,33	100,00
	L2	0,00	100,00	33,33	100,00	100,00
	L3	0,00	33,33	0,00	33,33	0,00
	L4	0,00	33,33	0,00	33,33	100,00
	L5	0,00	33,33	66,67	33,33	100,00
	L6	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00
	L7	0,00	100,00	0,00	66,67	66,67
	L8	0,00	100,00	0,00	33,33	0,00

Coronado	C1	0,00	0,00	66,67	66,67	100,00
	C2	0,00	66,67	0,00	66,67	66,67
	C3	0,00	100,00	33,33	0,00	33,33
	C4	0,00	66,67	0,00	0,00	33,33
	C5	0,00	33,33	33,33	100,00	33,33
	C6	33,33	33,33	0,00	33,33	100,00
	C7	0,00	66,67	100,00	100,00	33,33
	C8	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00
	S1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	S8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Anexo 4.** Datos normalizados de severidad, tratamientos con inoculo.

Tratamientos		Severidad				
		20ddi	40ddi	60ddi	80ddi	100ddi
Avenger	A1	35,26	35,26	0,00	54,74	54,74
	A2	0,00	35,26	35,26	35,26	54,74
	A3	35,26	35,26	54,74	0,00	35,26
	A4	0,00	35,26	54,74	90,00	35,26
	A5	35,26	35,26	35,26	90,00	35,26
	A6	0,00	35,26	0,00	54,74	35,26
	A7	0,00	54,74	35,26	54,74	0,00
	A8	0,00	0,00	0,00	90,00	90,00
Legacy	L1	0,00	35,26	54,74	35,26	90,00
	L2	0,00	90,00	35,26	90,00	90,00
	L3	0,00	35,26	0,00	35,26	0,00
	L4	0,00	35,26	0,00	35,26	90,00
	L5	0,00	35,26	54,74	35,26	90,00
	L6	0,00	0,00	35,26	0,00	0,00
	L7	0,00	90,00	0,00	54,74	54,74
	L8	0,00	90,00	0,00	35,26	0,00

	Coronado	C1	0,00	0,00	54,74	54,74	90,00
		C2	0,00	54,74	0,00	54,74	54,74
		C3	0,00	90,00	35,26	0,00	35,26
		C4	0,00	54,74	0,00	0,00	35,26
		C5	0,00	35,26	35,26	90,00	35,26
		C6	35,26	35,26	0,00	35,26	90,00
		C7	0,00	54,74	90,00	90,00	35,26
		C8	0,00	0,00	90,00	0,00	0,00
	SK6	S1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		S8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Anexo 5. Diámetro y peso**

Tratamientos		plantas sin inoculo		plantas con inoculo	
		Diámetro	Peso	Diámetro	Peso
Avenger	A1	13,00	73,00	9,00	31,00
	A2	14,00	60,00	8,00	28,00
	A3	13,50	49,00	8,00	26,00
	A4	12,00	48,00	9,50	32,00
	A5	12,00	50,00	11,00	47,00
	A6	13,00	52,00	10,00	57,00
	A7	12,00	49,00	9,00	26,00
	A8	14,00	55,00	10,00	33,00
	Promedio	12,94	54,50	9,31	35,00
Legacy	L1	16,00	94,00	8,00	29,00
	L2	13,00	54,00	9,00	26,00
	L3	14,50	63,00	9,00	35,00
	L4	11,00	44,00	9,00	31,00
	L5	12,00	52,00	7,00	14,00
	L6	12,00	46,00	11,00	58,00
	L7	12,00	48,00	9,00	50,00
	L8	14,00	50,00	10,00	57,00
	Promedio	13,06	56,38	9,00	37,50
Coronado	C1	14,50	83,00	7,00	22,00
	C2	17,00	127,00	8,00	24,00
	C3	14,50	108,00	9,00	33,00
	C4	15,00	102,00	9,00	40,00
	C5	16,00	137,00	11,00	48,00
	C6	15,00	92,00	7,00	15,00
	C7	14,50	80,00	9,00	28,00

	C8	14,00	83,00	9,00	47,00
	Promedio	15,06	101,50	8,63	32,13
SK6	S1	13,00	35,00	9,00	39,00
	S2	15,00	83,00	7,00	30,00
	S3	13,00	46,00	8,00	31,00
	S4	10,00	35,00	8,00	39,00
	S5	10,00	26,00	7,00	37,00
	S6	11,00	27,00	8,00	37,00
	S7	11,00	40,00	7,00	39,00
	S8	10,00	27,00	7,00	34,00
	Promedio	11,63	39,88	7,63	35,75

## Anexo 6. Recolección de muestras





### Anexo 7. Construcción del invernadero





### Anexo 8. Preparación del inóculo.



## Anexo 9. Cultivo



## Anexo 10. Manejo de malezas





### Anexo 11. Recolección de muestras





**Anexo 12.** *Plasmodiophora brassicae* Woronin

